

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Avaliação da toxicidade do antibiótico doxíciclina  
isoladamente e na presença de microplásticos na  
microalga marinha *Tetraselmis chuii***

Joana Correia Prata

Orientador(es)

**Professora Doutora Lúcia Guilhermino**

Co-Orientador(es)

**Professora Doutora Beatriz Lavorante**

Porto 2016

Relatório Final de Estágio  
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Avaliação da toxicidade do antibiótico doxíciclina  
isoladamente e na presença de microplásticos na  
microalga marinha *Tetraselmis chuii***

Joana Correia Prata

Orientador(es)

**Professora Doutora Lúcia Guilhermino**

Co-Orientador(es)

**Professora Doutora Beatriz Lavorante**

Porto 2016

## Resumo

---

Os objectivos do estágio cujas actividades se resumem no presente Relatório foram (i) adquirir treino nos métodos de cultura da microalga marinha *Tetraselmis chuii* (ii) avaliar a toxicidade de dois grupos de contaminantes ambientais emergentes, nomeadamente fármacos e microplásticos. Numa primeira fase, foram aprendidas metodologias para cultura da microalga em condições laboratoriais, efectuado um bioensaio utilizando a substância de referência dicromato de potássio para avaliação do estado de saúde das culturas, optimizada metodologia para a determinação das concentrações reais e de decaimento e realizada uma extensa revisão bibliográfica. De seguida, foram testadas as seguintes hipóteses:  $H_{01}$  – A doxiciclina não é tóxica para *T. chuii* a concentrações de exposição na ordem das partes por milhão (ppm);  $H_{02}$  – Os microplásticos não são tóxicos para *T. chuii* a concentrações de exposição na gama inferior das partes por milhão (ppm);  $H_{03}$  – A presença de microplásticos na água não influencia a toxicidade da doxiciclina para *T. chuii*. Para testar as hipóteses foram realizados 3 bioensaios toxicológicos com *T. chuii* com a duração de 96 horas, tendo como critério do efeito tóxico a inibição do crescimento. No bioensaio, a doxiciclina inibiu o crescimento da microalga com uma concentração efectiva mediana ( $CE_{50}$ ) de 19,52 mg/l, rejeitando-se a hipótese  $H_{01}$ . Nas concentrações testadas, os microplásticos não apresentaram inibição significativa das microalgas, aceitando-se a hipótese  $H_{02}$ . No bioensaio da doxiciclina na presença de microplásticos obteve-se  $CE_{50}$  de 11,90 mg/l e a análise estatística permitiu rejeitar  $H_{03}$ . Os resultados permitem sugerir que a presença de microplásticos no meio influencia a toxicidade de alguns fármacos, podendo torna-los mais tóxicos, como no caso da doxiciclina. Este efeito poderá levar à subestimação do impacto de poluentes nos organismos e ecossistemas, sendo necessário aprofundar o conhecimento sobre a toxicidade de outras substâncias na presença de microplásticos.

## Agradecimentos

---

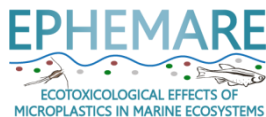
Quero agradecer à minha orientadora, a Professora Doutora Lúcia Guilhermino, pela disponibilidade e pelos ensinamentos. E à Professora Doutora Conceição Branco pelo apoio prestado.

À minha co-orientadora, a Professora Doutora Beatriz Lavorante, por me acompanhar no estágio, pela sua disponibilidade e paciência que me ajudaram a desenvolver os conhecimentos e técnicas na área.

Aos colegas de laboratório, pela simpatia e apoio prestado ao longo do estágio.

À minha família e amigos, pela compreensão e apoio. E ao meu namorado, o João Nogueira, pela motivação e companhia.

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto “EPHEMARE – Ecotoxicological effects of microplastics in marine ecosystems”, projeto aprovado no âmbito da JPI Oceans, Call microplastics, sendo a componente portuguesa financiada pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (referência: JPIOCEANS/0004/2015).



# Índice

---

<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Métodos</b>	<b>6</b>
2.1. Cultura de <i>Tetraselmis chuii</i>	6
2.1.1. Material	6
2.1.2. Meio Enriquecido F/2 de Guillard	6
2.1.3. Culturas de manutenção de <i>Tetraselmis chuii</i>	7
2.2. Métodos para determinação do comportamento das substâncias testadas	7
2.3. Condições dos Bioensaios	8
2.4. Análise estatística	8
<b>3. Resultados e Discussão</b>	<b>10</b>
3.1. Metodologia para cultura da microalga e bioensaios	10
3.1.1. Cultura de <i>Tetraselmis chuii</i>	10
3.2. Teste de referência com dicromato de potássio	11
3.2.1. Métodos para determinação do comportamento das substâncias testadas	11
3.2.2. Bioensaio com dicromato de potássio	12
<b>4. Bioensaios</b>	<b>14</b>
4.1. Metodologia para cultura da microalga e bioensaios	14
4.2. Avaliação dos efeitos tóxicos	15
4.2.1. Bioensaio com doxiciclina	16
4.2.2. Bioensaio com microplásticos	20
4.2.3. Bioensaio com doxiciclina na presença de microplásticos	21
<b>5. Conclusão</b>	<b>25</b>
<b>6. Bibliografia</b>	<b>26</b>
<b>Anexos</b>	<b>31</b>
Anexo I: Meio enriquecido F/2 de Guillard	31
Anexo II: Tabelas de pH dos bioensaios	32
Anexo III: Espectros de absorção dos compostos	34

## 1. Introdução

---

A presença global de contaminantes ambientais de origem antropogénica poderá ter impacto negativo nos ecossistemas a longo prazo (Nunes *et al.* 2005). Da elevada diversidade de contaminantes ambientais, os designados contaminantes ambientais emergentes suscitam actualmente elevada preocupação devido às lacunas que ainda existem sobre a sua toxicidade e aos efeitos que podem causar na saúde animal e humana por exposição ambiental. Por exemplo, os plásticos têm uma distribuição universal nos oceanos e a sua produção continua a aumentar, sendo que em 2014 a produção mundial foi de 311 milhões de toneladas (PlasticsEurope 2015; Thompson 2009). Ao sofrerem fragmentação originam partículas heteorogéneas, de tamanho inferior a 5 mm, denominados microplásticos (definido pela National Oceanographic and Atmospheric Agency). Devido à fragmentação de detritos plásticos maiores e à sua lenta degradação, a quantidade de microplásticos nos oceanos tende a aumentar, mesmo que sejam aplicadas medidas para evitar a entrada de plásticos no ambiente (Thompson 2009). Os fármacos são substâncias emergentes de elevada preocupação (Milić *et al.* 2013). A bioactividade inerente, combinada com a elevada solubilidade em água, baixa degradação e elevados valores excretados sem metabolização poderão, em alguns casos, causar efeitos adversos nos ecossistemas e na saúde pública (Milić *et al.* 2013). O consumo de antibióticos, fármacos que inibem o crescimento ou eliminam bactérias, tem aumentado anualmente, sendo usados em medicina humana, veterinária e aquacultura (Milić *et al.* 2013). A presença de antibióticos no ambiente aquático, apesar de em baixas concentrações, tem sido causa de preocupação, pois podem originar resistências bacterianas e ter impacto nos ecossistemas aquáticos e saúde humana (Milić *et al.* 2013).

As tetraciclina são antibióticos de largo espectro usados em medicina humana e veterinária, sendo um dos antibióticos mais prevalente em águas residuais (Milić *et al.* 2013). Foram descobertas em 1948 após o isolamento da clortetraciclina de uma cultura de *Streptomyces aureofaciens* e derivados foram obtidos por variação dos ligandos dos carbonos 5, 6 e 7 (Chopra e Roberts 2001; Graeme e Pollack 1996). As tetraciclina ultrapassam a membrana de organismos gram negativos como um complexo magnésio-tetraciclina e a dos gram positivos na sua forma lipofílica simples (Chopra e Roberts 2001; Graeme e Pollack 1996; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). No citoplasma, ligam-se reversivelmente a um local de elevada afinidade na subunidade 30s do ribossoma bacteriano. Desta forma, impedem a ligação do aminoacetil-tRNA ao local receptor do mRNA, prevenindo a adição de aminoácidos ao péptido

em formação, e impossibilitando a transcrição e consequentemente o crescimento bacteriano (acção bacteriostática) (Chopra e Roberts 2001; Graeme e Pollack 1996; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). A formação de complexos com catiões bivalentes também pode estar envolvida na actividade antimicrobiana das tetraciclinas e interferir com a sua absorção e distribuição (Campbell e Hasinoff 1991; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). A doxiciclina é uma tetraciclina de segunda geração que apresenta maior lipofilicidade, maior tempo de semi-vida no soro (16 a 18 horas) e maior actividade antimicrobiana, com menos efeitos adversos quando comparada com as restantes tetraciclinas (Chopra e Roberts 2001; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). A forma de cloridrato permite maior solubilidade e estabilidade (Chopra e Roberts 200; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). É utilizada no tratamento de bactérias gram positivas, gram negativas e alguns protozoários, incidindo principalmente em infecções respiratórias, da pele e tecidos moles, sistema genitourinário e intrabdominais (Graeme e Pollack 1996; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). Em veterinária, é administrada na água de bebida (suínos, bovinos, aves), no alimento (suínos) ou em comprimidos (canino, felino) (Almeida *et al.* 2014). Tem excreção renal, biliar e fecal, sendo a maioria pela última através da difusão para o lúmen do intestino delgado (Graeme e Pollack 1996; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). As tetraciclinas têm sido detectadas com frequência no ambiente aquático em concentrações de µg/l em locais como os Estados Unidos da América e China, onde são usadas como promotores de crescimento em pecuária (Milić *et al.* 2013). Parte da dose administrada é excretada por via renal e via fecal, havendo contaminação de bio sólidos e estrumes que entram no ambiente como fertilizantes agrícolas, podendo acumular-se devido a aplicações recorrentes (Fernández *et al.* 2004). Assim ocorre exposição directa de organismos terrestres, principalmente das camadas superiores do solo, e águas de lixiviação poderão transportar estes compostos para os ecossistemas aquáticos (Fernández *et al.* 2004). A adsorção à fase sólida do solo e complexação com metais em bio sólidos leva à acumulação de tetraciclinas e redução da sua fotodegradação, mantendo-se no meio por elevados períodos de tempo (Fernández *et al.* 2004). A excreção ou aplicação de doses excessivas em alimento ou água de tetraciclinas nas aquaculturas são possíveis vias de contaminação dos ambientes adjacentes a estes sistemas, podendo ocorrer acumulação no sedimento (Hirsch *et al.* 1999; Rico *et al.* 2013). A doxiciclina está presente em bio sólidos onde apresenta um tempo de dissipação entre 53 a mais de 77 dias (Fernández *et al.* 2004). Em Portugal, a sua aplicação é principalmente veterinária, sendo que o uso em 2011 foi de 0,247 toneladas em medicina humana e 28 273 toneladas em medicina veterinária (Almeida *et al.* 2014). Na aquacultura de *Pangasius* no Vietnam, a doxiciclina representa 34% dos antibióticos usados (Rico *et al.* 2013). No meio marinho, foram detectadas

concentrações de 0,26 ng/l na água e de no 1,33 µg/kg sedimento em Dalian, na China (Na *et al.* 2013). Apesar da rápida degradação em solução, a doxiciclina poderá apresentar persistência devido à introdução recorrente no ambiente (Brain *et al.* 2004). As tetraciclinas podem actuar em organelos com maquinaria de transcrição procariótica que possuam subunidades 30S, como os cloroplastos, levando à diminuição da eficiência fotossintética, e as mitocôndrias, ocorrendo a formação de espécies de oxigénio reactivas (Wang *et al.* 2015). A quelação de cálcio intracelular tem consequências na função celular, podendo interferir com a síntese proteica ou induzir efeito tóxico (Wang *et al.* 2015). Em organismos marinhos, a oxitetraciclina revelou ter impacto sobre o crescimento da alga *Tetraselmis chuii* (Ferreira *et al.* 2007). Para a microalga *Clorella vulgaris*, a doxiciclina apresentou uma concentração de efeito 50% às 48 horas de 15,2 mg/l (Fernández *et al.* 2004). A aplicação recorrente de doxiciclina poderá ter consequência na saúde humana através do consumo de alimentos contaminados, sendo que na União Europeia em 2014 e 2015 foram reportados resíduos entre 3 a 224 µg/kg em camarões provenientes do Vietnam (RASFF 2016).

Em 2014, na Europa, 39,5% da produção de plástico destinou-se a embalagens, sendo uma grande porção descartável (Andrady 2011; PlasticsEurope 2015). A fragmentação de plásticos utilizados diariamente ou presentes no ambiente, sujeitos a acção da radiação ultravioleta, calor e forças físicas, dá origem a microplásticos secundários (Andrady 2011; Thompson 2009). A degradação ocorre por foto-oxidação devido à exposição a luz ultravioleta, e poderá desenvolver-se como termo-oxidativa (Andrady 2011). Devido ao elevado peso molecular, não ocorre biodegradação significativa, apenas fragmentação em partículas de menor dimensão (Andrady 2011). Esta ocorre principalmente em praias onde, ao contrário do oceano, há exposição a elevadas temperaturas, intensidades luminosas e concentrações de oxigénio (Andrady 2011). Os microplásticos primários apresentam-se originalmente como partículas, em abrasivos, cosméticos e *pellets* utilizadas na produção de plásticos (Andrady 2011; Thompson 2009). Os microplásticos apresentam uma distribuição mundial no ambiente marinho, e atingem elevadas concentrações na água e sedimento, principalmente em zonas de maior densidade populacional ou industriais (Frias *et al.* 2014; Norén 2007; Thompson 2009). Na Suécia foi detectada a concentração de 102 000 n°/m<sup>3</sup> na água do mar adjacente a um porto industrial onde se produz polietileno (Norén 2007). Em Portugal, entre diversos locais estudados, os microplásticos são particularmente abundantes na Costa Vicentina e em Lisboa (0,033 e 0,036 n°/m<sup>3</sup> respectivamente, em zooplâncton recolhido na costa) (Frias *et al.* 2014). A contaminação da Costa Vicentina tem uma origem provável na zona industrial e porto de Sines (Frias *et al.* 2014). No giro oceânico do



Pacífico sul, em 2011, a concentração média de microplásticos detectada na água foi de 26 898 partículas/km<sup>2</sup>, apresentando maior concentração no seu centro, onde atingia as 396 342 partículas/km<sup>2</sup> (Eriksen *et al.* 2013). A presença dos plásticos no ambiente poderá ser lesiva aos organismos devido ao seu efeito em isolado através de danos físicos e toxicológicos ou devido ao aumento do *stress* provocado por contaminantes tradicionais onde poderão actuar como vectores (Thompson 2009, Besseling *et al.* 2014). Os microplásticos podem causar inibição no crescimento do fitoplâncton através do seu efeito de sombra, diminuição dos níveis de clorofila e consequente diminuição da fotossíntese (Besseling *et al.* 2014; Bhattacharya *et al.* 2010; Sjollem *et al.* 2016). A internalização de microplásticos em algas é pouco provável devido às suas elevadas dimensões, no entanto a adsorção à superfície poderá causar dano na parede celular com formação de poros e possível penetração de partículas (Bhattacharya *et al.* 2010; Davarpanah e Guilhermino 2015). Estas partículas poderão aderir à celulose na superfície da célula através de pontes de hidrogénio entre estruturas aromáticas, dependendo da carga de superfície, espécie de alga e concentração de microplásticos no meio (Bhattacharya *et al.* 2010). A sua adsorção poderá impedir o fluxo de CO<sub>2</sub> e nutrientes, promover a produção de radicais livres de oxigénio e comprometer a mobilidade das células através da adsorção ao flagelo (Bhattacharya *et al.* 2010; Sjollem *et al.* 2016). No entanto, num estudo realizado em *Tetraselmis chuii*, utilizando concentrações de microplásticos até 1,472 mg/l não foi possível determinar efeitos negativos estatisticamente significativos (Davarpanah e Guilhermino 2015). *Stress* em algumas espécies de alga resulta na libertação de exopolissacarídeos, que coagulam e formam partículas originando agregação celular, podendo ocorrer incorporação accidental e concentração de microplásticos (Long *et al.* 2015). A incorporação de microplásticos altera a permeabilidade e aumenta a densidade dos agregados, resultando numa estrutura menos fractal, podendo explicar a elevada concentração de microplásticos encontrada no fundo oceânico (Long *et al.* 2015). A biodisponibilidade dos microplásticos pode ser alterada devido à sua incorporação em agregados e biofilmes e a presença de matéria orgânica pode dificultar a sua detecção (Gorokhova 2015; Long *et al.* 2015). Desta forma, os microplásticos poderão acarretar risco para os seres vivos, como por exemplo em bivalves onde já foram encontrados em células epiteliais digestivas e no sistema circulatório (Vandermeersch *et al.* 2015). Em juvenis dos peixes *Pomatoschistus microps*, os microplásticos causaram redução na actividade da acetilcolinesterase podendo ter impactos negativos na sua fisiologia e comportamento (Oliveira *et al.* 2013). A presença de microplásticos causa diminuição da eficiência predatória dos peixes, ocorrendo ingestão destas partículas em vez de alimento, o que pode originar diminuição do crescimento, menor eficiência reprodutiva e mortalidade, tendo um impacto negativo na população (Sá *et al.* 2015). No ambiente, os

microplásticos adsorvem, concentram e transportam contaminantes, como aditivos dos plásticos, poluentes orgânicos persistentes e metais, devido à hidrofobicidade de alguns destes compostos (Andrady 2011; Bhattacharya *et al.* 2010; Thompson 2009). Os poluentes estão presentes em baixas concentrações nos oceanos e poderão ser concentrados por microplásticos (Andrady 2011). Por exemplo, estudos laboratoriais demonstraram que polímeros de cloreto de polivinil e polietileno adsorveram diclorodifeniltricloroetano (DDT) e fenantreno, representantes de poluentes persistentes (Bakir *et al.* 2012). A ingestão de microplásticos poderá expor organismos e a cadeia trófica a estas substâncias e de forma concentrada (Andrady 2011; Bhattacharya *et al.* 2010). A análise de *pellets* de polietileno recolhidas em praias de 17 países revelou que transportavam poluentes orgânicos persistentes, como DDT, e que a concentração de alguns poluentes presentes nos microplásticos apresentavam uma correlação positiva com a sua concentração em tecidos de moluscos (Ogata *et al.* 2009). Em *Pomatoschistus microps*, a presença de microplásticos causou a redução da toxicidade do pireno, mas originou diminuição do isocitrato desidrogenase reduzindo a capacidade de obtenção de energia na respiração celular (Oliveira *et al.* 2013). Exemplares do bivalve marinho *Mytilus galloprovincialis* provenientes do estuário do Tejo possuíam uma concentração de microplásticos de 0,34 n°/g de tecido, enquanto que em bivalves para consumo humano foi detectada a concentração de 0,35 n°/g (Vandermeersch *et al.* 2015). Estima-se que os humanos sejam expostos a cerca de 300 microplásticos por ano através do consumo de moluscos, sendo que no corpo humano, sob acção do pH ácido e enzimas digestivas poderão libertar contaminantes (Vandermeersch *et al.* 2015). O conhecimento sobre o risco e distribuição destas partículas ainda é limitado, pelo que deverão ser desenvolvidos protocolos de monitorização (Thomson 2009; Vandermeersch *et al.* 2015).

Os ecossistemas aquáticos são os mais afectados pelos contaminantes ambientais, tendo maior relevância o seu impacto nos produtores primários, uma vez que constituem a base da cadeia trófica (Nunes *et al.* 2005; Nunes *et al.* 2008). *Tetraselmis chuii* é uma microalga abundante nos ecossistemas estuarinos europeus e que se adequa à realização de testes toxicológicos devido à facilidade de cultura em ambiente laboratorial (Ferreira *et al.* 2007; Nunes *et al.* 2005; Nunes *et al.* 2008). Os bioensaios toxicológicos têm como objectivo a obtenção de concentrações com efeito na mortalidade ou função de organismos que são expressas como concentração de efeito x% (CE<sub>x</sub>) (European Chemicals Agency 2008). Os resultados dos testes de toxicidade são relevantes para a REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (European Chemicals Agency 2008).

O estágio teve como objectivos (i) treino de metodologia de cultura da microalga marinha *Tetraselmis chuii*, vulgarmente utilizada em Ecotoxicologia e Avaliação de Risco Ambiental para

avaliar a toxicidade e risco de substâncias químicas para produtores primários de ecossistemas marinhos (ii) avaliação da toxicidade de dois compostos representativos de contaminantes ambientais emergentes, a doxiciclina e os microplásticos, visado testar as seguintes hipóteses nulas:

- H<sub>01</sub> - A doxiciclina não é tóxica para *T. chuii* a concentrações de exposição na ordem das partes por milhão (ppm).
- H<sub>02</sub> - Os microplásticos não são tóxicos para *T. chuii* a concentrações de exposição na gama inferior das partes por milhão (ppm).
- H<sub>03</sub> - A presença de microplásticos na água não influencia a toxicidade da doxiciclina para *T. chuii*.

## 2. Métodos

---

### **2.1. Cultura de *Tetraselmis chuii***

#### **2.1.1. Material**

O material utilizado na cultura e bioensaios foi descontaminado em ácido e lavado cinco vezes em água destilada. O material em contacto com as algas foi previamente autoclavado a 121° por 35 minutos (autoclave Uniclave 88 ajc). As culturas foram mantidas em frascos de vidro Erlenmeyer de 500 ml com 400 ml de meio F/2. As tampas permitem a passagem de três tubos: um para aeração que foi ligado a um filtro (filtros Millex-GS, 0,22 µm), outro para saída do ar com cobertura com algodão e o último tubo para recolha de amostras fechado com uma mola metálica.

#### **2.1.2. Meio enriquecido F/2 de Guillard**

As substâncias usadas na preparação do meio foram fornecidas pela Merck ou Sigma-Aldrich. Três soluções de reserva contendo os nutrientes do meio foram preparadas e armazenadas no frigorífico (5°C), para serem adicionadas na proporção de 1 ml por 1 l de água do mar. A água do mar foi recolhida na costa noroeste de Portugal (oceano Atlântico) e filtrada. Antes da sua utilização, foi novamente filtrada utilizando-se filtros de papel em micro-fibras de vidro (filtros Munktell, 0,45 µm), e a salinidade ajustada a 30‰ com água destilada. As soluções de reserva foram adicionadas e o meio autoclavado a 121°C por 35 minutos para esterilização. Os meios foram arrefecidos em gelo para evitar precipitação e mantidos sob aeração com ar filtrado (filtros Millex-GS, 0,22 µm). A solução de vitaminas (tiamina, biotina e B12) foi preparada previamente, esterilizada por filtração (filtros Millex-GS, 0,22 µm) e armazenada em Eppendorfs

no congelador (-18°C). No momento da inoculação, 0,5 ml da solução de vitaminas foi adicionada a cada litro de meio (Guillard 1975). A composição final do meio encontra-se em anexo (Anexo I).

### **2.1.3. Culturas de manutenção de *Tetraselmis chuii***

As algas foram mantidas numa câmara a temperatura constante (20±1°C) e com fotoperíodo de 24 horas de luz. O meio F/2 foi inoculado com um volume necessário a atingir concentrações de 10<sup>4</sup> células/ml. Após atingir a fase de crescimento exponencial, o meio de cultura foi renovado a cada 3 dias através da remoção de metade do volume e reposição com meio F/2. Para evitar precipitação das células, os frascos foram agitados duas vezes por dia. A manipulação das culturas e materiais foi efectuada de forma a evitar a contaminação das culturas de microalgas.

### **2.2. Métodos para determinação do comportamento das substâncias testadas**

A concentração de doxiciclina e dicromato de potássio foi determinada por espectrofotometria (Modelo V-630 Jasco), e a de microplásticos por espectrofluorometria (Modelo FP-6200 Jasco). Para cada composto foram realizadas previamente três soluções independentes preparadas em meio F/2. Para a doxiciclina e dicromato de potássio realizaram-se leituras do espectro UV de soluções nas concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 mg/l, sendo que se determinou o limite inferior de detecção a 2 mg/l e o limite superior de detecção a 32 mg/l. Para concentrações superiores ao limite de detecção foi realizada diluição em meio F/2 de forma a atingir a concentração de 32 mg/l. O pico de maior absorção da doxiciclina foi registado a 375 nm, enquanto que o do dicromato de potássio foi registado a 370 nm, pelo que foram esses os comprimentos de onda utilizados para determinar as concentrações reais de exposição e o decaimento das substâncias no meio de teste durante os bioensaios. Segundo a recomendação do fabricante, os microplásticos foram determinados por espectrofluorometria com excitação a 575 nm e emissão a 607 nm, nas seguintes concentrações 0,012, 0,024, 0,047, 0,094, 0,1875, 0,375, 0,75, 1,5, 3, 6, 12 mg/l. Os limites de detecção foram determinados a 0,375 e a 12 mg/l, não sendo possível determinar com precisão concentrações inferiores e superiores, respectivamente. Concentrações de microplásticos superiores ao limite de detecção foram sujeitas a diluição em meio F/2 de forma a atingirem a concentração de 12 mg/l. Para cada substância, a correlação entre a concentração e absorvância foi determinada recorrendo ao coeficiente de correlação de Pearson. Seguidamente, para cada substância foi ajustado um modelo de regressão linear aos dados. Durante o bioensaio, as concentrações das substâncias foram determinadas às 0 e 96 horas, utilizando os modelos de regressão linear ajustados aos dados.

### **2.3. Condições dos bioensaios**

Os bioensaios para avaliação dos efeitos tóxicos das substâncias teste em *T. chuii* foram realizados em termos gerais de acordo com o protocolo da OECD para bioensaios toxicológicos com microalgas, tendo sido efectuadas algumas adaptações sempre que necessário (OECD 2011). Realizaram-se 3 bioensaios independentes em frascos de 500 ml contendo um volume de 400 ml de meio realizado conforme o mencionado para cultura de *Tetraselmis chuii*. No dia do teste retirou-se uma amostra da cultura parental para contagem das células. O volume de cultura parental a adicionar a cada frasco de 400 ml de teste foi calculado de forma a obter concentrações finais de aproximadamente  $10^4$  células/ml. Em cada bioensaio, foram testados diversos tratamentos e utilizadas três réplicas de culturas por tratamento. Os bioensaios foram efectuados durante 96 horas numa câmara incubadora (Bronson PGC1400) com fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro), intensidade luminosa de  $90 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , a temperatura constante de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ . O meio não foi renovado e as culturas foram agitadas duas vezes por dia.

As amostras para contagem de células, de forma a verificar o crescimento das culturas, e o pH foram recolhidos diariamente. O pH foi medido usando uma sonda multiparamétrica (Hach HQ40d Portable Multi-Parameter). A contagem foi realizada usando a Improved Neubauer haemocytometer (Marienfeld, Alemanha). A determinação da concentração das substâncias foi realizada às 0 e 96 horas de acordo com o descrito anteriormente (secção 2.2.).

O cloridrato de doxiciclina e dicromato de potássio de grau analítico (>98% de pureza) foram fornecidos pela Sigma-Aldrich e Merck Millipore, respectivamente. As soluções de reserva de cada uma das substâncias foram preparadas em água ultra-pura e submetidas a diluições sucessivas com água ultra-pura. Todas as concentrações das soluções foram adicionadas no mesmo volume aos frascos contendo meio F/2 com o objectivo de reduzir a variação de volume. O dicromato de potássio foi testado em concentrações de 2 a 128 mg/l e a doxiciclina entre 4 a 128 mg/l. Os microplásticos de polietileno (1 – 5  $\mu\text{m}$ , Cospheric – Inovations and Microtecnology) foram testados em concentrações de 0,75 a 48 mg/l. No bioensaio da doxiciclina com microplásticos foram testadas concentrações de doxiciclina de 4 a 128 mg/l na presença de 1,5 mg/l de microplásticos.

### **2.4. Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o programa SPSS versão 23. A inibição do crescimento dos vários tratamentos do bioensaio foi determinada usando os valores da contagem de células obtida às 96 horas na seguinte fórmula:

$$Inibição (\%) = 100 - \left( 100 \times \frac{\text{média do número de células no tratamento}}{\text{média do número de células no controlo}} \right)$$

A variação média do pH em cada bioensaio foi calculada através da subtracção do valor médio inicial ao valor médio final. A concentração das substâncias no meio de teste foi determinada utilizando-se a absorvância do meio de teste lida às 0 e 96 horas (375 nm para doxiciclina, 370 nm para dicromato de potássio), com base nos modelos de regressão linear previamente determinados (secção 2.2.). O valor médio de absorvância obtida no controlo foi subtraído de todos os tratamentos. A percentagem de desvio das concentrações reais de exposição relativamente às concentrações nominais foi determinada de acordo com a seguinte fórmula:  $y = 100 - (100 * \text{concentração no teste} / \text{concentração nominal})$ . Para determinação do decaimento da substância no meio de teste ao longo das 96 horas utilizou-se a seguinte fórmula:  $y = 100 - (100 * \text{absorvância às 96 horas} / \text{absorvância às 0 horas})$ .

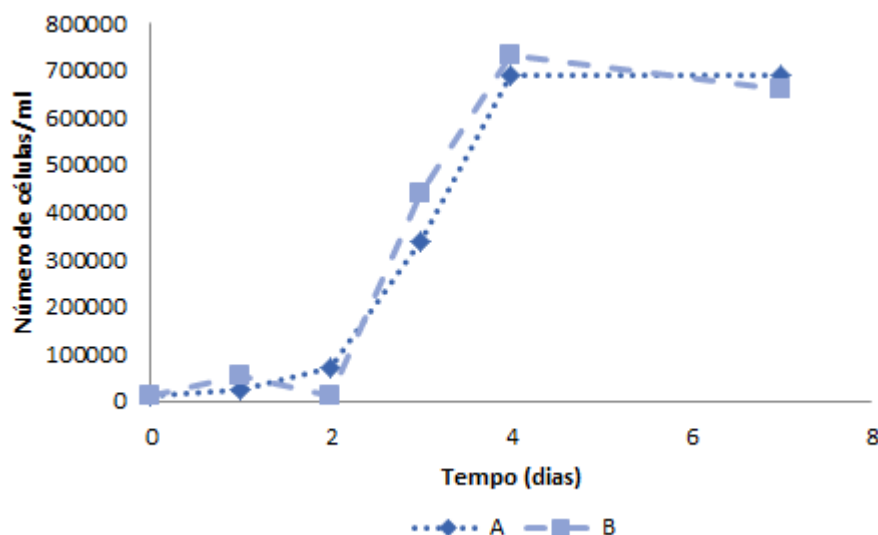
As concentrações medianas de efeito a 10%, 20% e 50% designadas respectivamente por CE<sub>10</sub>, CE<sub>20</sub> e CE<sub>50</sub>, foram determinadas a partir das curvas de toxicidade (logaritmo da concentração da substância *versus* transformação probit da percentagem de efeito). Para a determinação das concentrações medianas de efeito do dicromato de potássio foram excluídos os resultados das concentrações 64 e 128 mg/l, uma vez que não cumpriam as normas de variação e tinham efeitos negativos sobre a determinação dos intervalos de confiança.

Em cada bioensaio, o número médio de células em diferentes tratamentos foi comparado utilizando uma análise de variância (ANOVA) de um factor. Quando se encontraram diferenças significativas entre tratamentos foi efectuado o teste de comparações múltiplas de Tukey para discriminar tratamentos significativamente diferentes entre si. Os dados dos testes da doxiciclina e dicromato de potássio, necessitaram de ser transformados antes da realização da ANOVA, recorrendo à transformação  $\log(x+1)$ , visto apresentarem heterogeneidade de variâncias, conforme indicado pelo teste de Levene. Apesar de terem sido tentadas várias transformações, os resultados do teste de homogeneidade não permitiram validar a ANOVA do ensaio da doxiciclina na presença de microplásticos, portanto realizou-se um teste de Welch para avaliar a diferença entre grupos. Foi realizada uma análise de co-variância (ANCOVA) para comparar as curvas de toxicidade dos ensaios da doxiciclina na ausência e presença de microplásticos. O nível de significância foi de 0,05.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Metodologia para cultura da microalga e bioensaio

##### 3.1.1. Cultura de *Tetraselmis chuii*



**Figura 1:** Curvas de crescimento de duas culturas (A, B) da microalga marinha *Tetraselmis chuii* em meio F/2 durante 7 dias.

Para avaliar o crescimento da alga *Tetraselmis chuii*, duas culturas foram submetidas a condições de manutenção (secção 2.1.3.) e mantidas por 7 dias sem mudança do meio de cultura. Diariamente foram retiradas amostras para a contagem de células e determinação do pH.

O crescimento das culturas relaciona-se com a disponibilidade em nutrientes (Creswell 2010; Nunes *et al.* 2008). Após a inoculação com baixa densidade celular, as algas necessitam de um período de adaptação e para iniciarem o crescimento (*lag-time phase*) (Creswell 2010; Nunes *et al.* 2008). Este período depende da densidade celular inicial, da espécie e das condições de teste (luz e temperatura) (Creswell 2010; Nunes *et al.* 2008). De seguida dá-se uma aceleração do ritmo de divisão, aumentando o número de células de forma exponencial (Creswell 2010; Nunes *et al.* 2008). Quando a capacidade de carga do meio é atingida, a divisão celular diminui e há estabilização do número celular (período estacionário) (Creswell 2010; Nunes *et al.* 2008). Isto deve-se à limitação dos nutrientes, à sombra das próprias algas e às mudanças do meio devido a alterações de pH e acumulação de resíduos metabólicos (Creswell 2010; Nunes *et al.* 2008).

Por último, segue uma fase senescente com morte e diminuição da densidade de algas (Creswell 2010; Nunes *et al.* 2008).

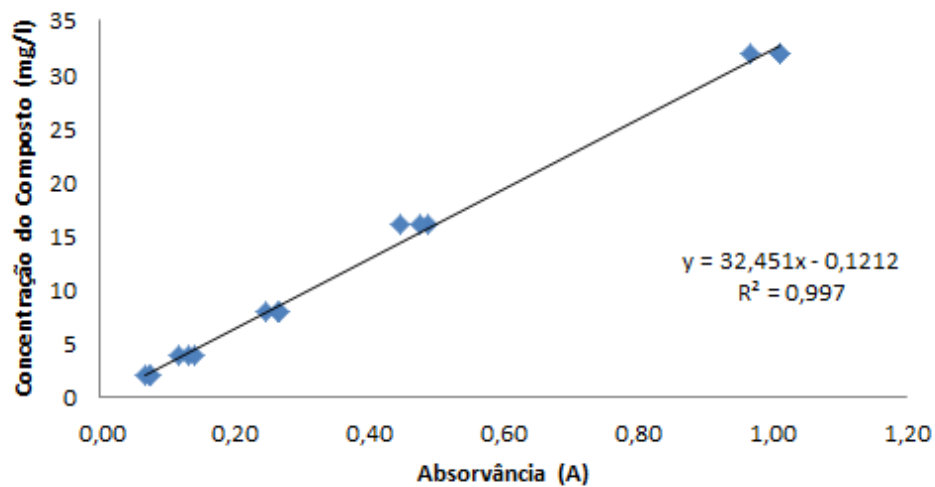
As culturas foram inoculadas de forma a apresentarem concentrações iniciais de  $10^4$  células/ml. Nos primeiros dois dias observou-se um crescimento celular reduzido sugestivo da *lag-time phase* devido ao reduzido número de células das culturas e consequentemente da sua capacidade de multiplicação (Figura 1). O período de crescimento exponencial decorreu entre o segundo e quarto dia de cultura. O crescimento celular estabilizou entre o quarto dia e o sétimo dia, sendo sugestivo do período estacionário. No período de 96 horas, o pH variou entre 7,8 unidades de pH no início do teste e às 9,9 unidades de pH, o que corresponde a uma variação de 2,1 unidades de pH. Esta variação inerente ao crescimento da microalga ultrapassa a variação de 1,5 unidades de pH recomendada para bioensaio pela OECD (OECD 2011).

### **3.2. Teste de referência com dicromato de potássio**

#### **3.2.1. Métodos para determinação do comportamento das substâncias testadas**

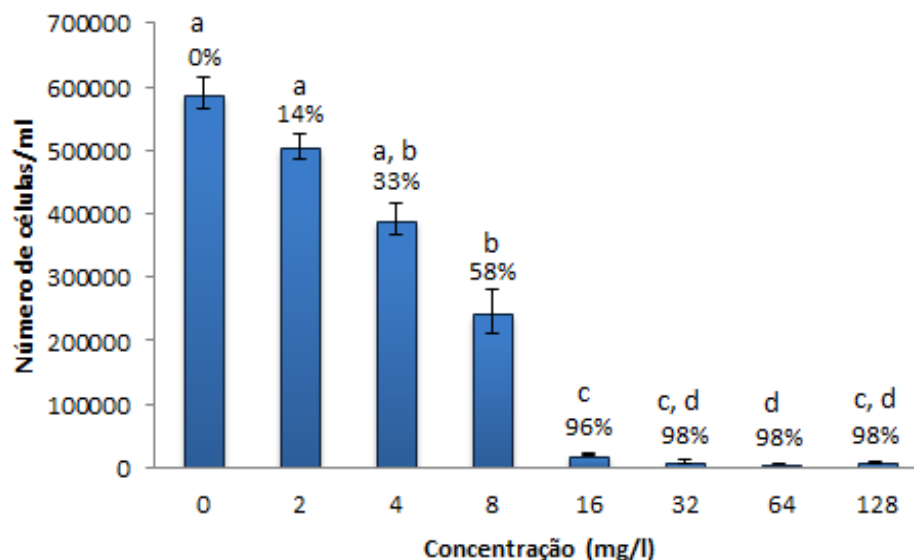
O espectro de absorção do dicromato de potássio em meio F/2 (Anexo III) revelou a presença de dois picos a 258 nm e 370 nm, em concordância com o referido na literatura (Sena *et al.* 2000). Para a determinação das concentrações de dicromato de potássio utilizou-se os valores de absorvância medidos a 370 nm (secção 2.2.). Devido aos limites de detecção do espectrofotómetro, apenas foi possível realizar uma leitura da absorvância com exactidão de concentrações entre 2 e 32 mg/l. Obteve-se uma correlação positiva significativa entre a absorvância e a concentração e modelo de regressão linear ajustado (Figura 2).





**Figura 2:** Modelo de regressão linear ajustado aos dados da absorvância e concentração do dicromato de potássio em meio F/2.

### 3.2.2. Bioensaio com dicromato de potássio



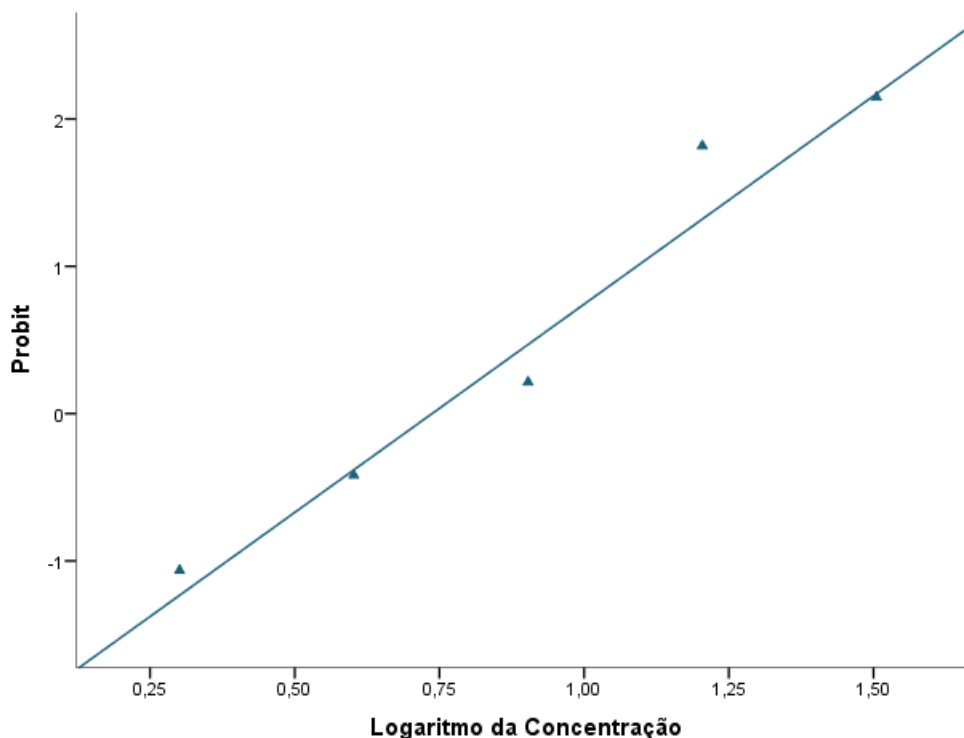
**Figura 3:** Média do número de células com o respectivo erro padrão da média em cada tratamento às 96 horas em algas expostas a dicromato de potássio e na ausência da substância (controle – 0). Sobre as barras é representada a percentagem média de inibição do crescimento da microalga em cada tratamento e relativamente ao crescimento médio do controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ( $p = 0,05$ ) determinadas pelo teste de comparações múltiplas de tukey efectuado após a ANOVA quando esta análise indicou diferenças significativas ( $p = 0,05$ ) entre tratamentos.

Os tratamentos com dicromato de potássio com concentrações elevadas apresentaram uma cor amarela característica da solução deste composto. Durante o teste, a variação média do pH foi de 0,94 unidades, sendo a média do valor inicial de 7,72 e a final 8,67 unidades de pH (Anexo II). A variação média da concentração do teste à nominal foi de 7,15% e o decaimento médio às 96 horas de 0,97%. Estes valores estão de acordo com o recomendado pela OECD e permitem validar o teste.

O dicromato de potássio é uma substância de referência que permite avaliar a reprodutibilidade dos testes e sensibilidade dos organismos de laboratório ao longo do tempo sendo recomendado para esse efeito nas normas da OECD para vários organismos (Environmental Science and Technology Center 2007; OECD 2011). Registaram-se diferenças significativas no crescimento das culturas expostas a distintas concentrações do dicromato de potássio (ANOVA,  $F_{(7, 16)} = 127,976$ ,  $p = 0,000$ ) tendo ocorrido inibição significativa do mesmo a concentrações iguais ou superiores a 8 mg/l. A  $CE_{50}$  determinado às 96 horas foi de 5,46 mg/l (3,71 – 7,75 mg/l) (Figura 3 e 4, Tabela 1). Em *Chlorella vulgaris* obteve-se uma  $CE_{50}$  às 96 horas de 0,39 mg/l (Borecka *et al.* 2016), o que é sugestivo de maior resistência aos xenobióticos por *Tetraselmis chuii*.

Dicromato de Potássio (mg/l)					
72 horas			96 horas		
CE <sub>10</sub>	CE <sub>20</sub>	CE <sub>50</sub>	CE <sub>10</sub>	CE <sub>20</sub>	CE <sub>50</sub>
1,24	1,88	4,17	1,92	2,75	5,46
(0,29-2,22)	(0,62-3,04)	(2,41-6,18)	(0,74-2,99)	(1,34-3,99)	(3,71 – 7,75)

**Tabela 1:** Valores de CE obtidos às 72 e 96 horas na alga *Tetraselmis chuii* exposta a várias concentrações de dicromato de potássio.



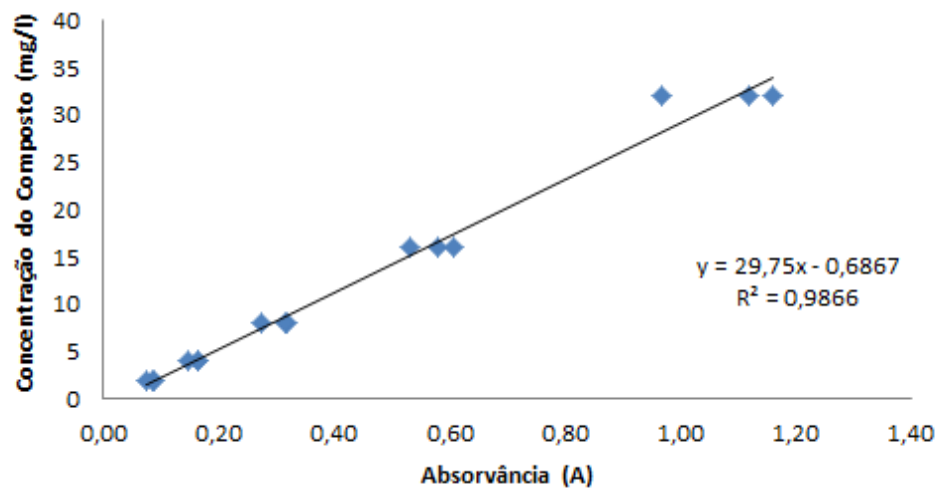
**Figura 4:** Curva de toxicidade logaritmo (base 10) da concentração de dicromato de potássio em mg/l versus transformação probit da percentagem de inibição do crescimento de *Tetraselmis chuii* ( $y = 2,827X - 2,084$ ).

## 4. Bioensaios

### 4.1. Métodos para determinação do comportamento das substâncias testadas

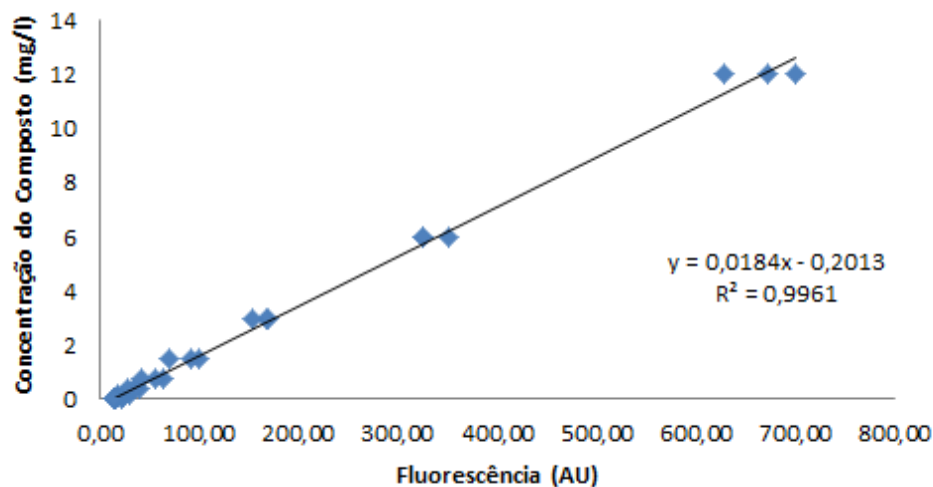
Para avaliação da possível interferência na leitura da absorvância dos compostos, o espectro do meio F/2 foi realizado através da leitura do espectro UV entre 200 e 700 nm. Observou-se um pico de absorvância máxima a 222 nm, impedindo a leitura de compostos com picos de absorvância inferiores a 250 nm (Anexo III).

O espectro de absorção da doxiciclina em meio F/2 (Anexo III) revelou a presença de três picos a 245 nm, 272 nm, e 375 nm, em concordância com o referido na literatura (Lofty *et al.* 2016). Para a determinação das concentrações de doxiciclina utilizou-se os valores de absorvância medidos a 375 nm (secção 2.2.). Devido aos limites de detecção do espectrofotômetro, apenas foi possível realizar uma leitura da absorvância com exactidão de concentrações entre 2 e 32 mg/l. Obteve-se uma correlação positiva significativa entre a absorvância e a concentração e modelo de regressão linear ajustado (Figura 5).



**Figura 5:** Modelo de regressão linear ajustado aos dados da absorvância e concentração doxiciclina em meio F/2.

A curva dos microplásticos foi determinada no espectrofluorímetro recorrendo às recomendações do fabricante usando um comprimento de onda de excitação de 575 nm e de emissão de 607 nm (secção 2.2.). Obteve-se uma correlação positiva significativa entre a fluorescência e a concentração e modelo de regressão linear ajustado (Figura 6).

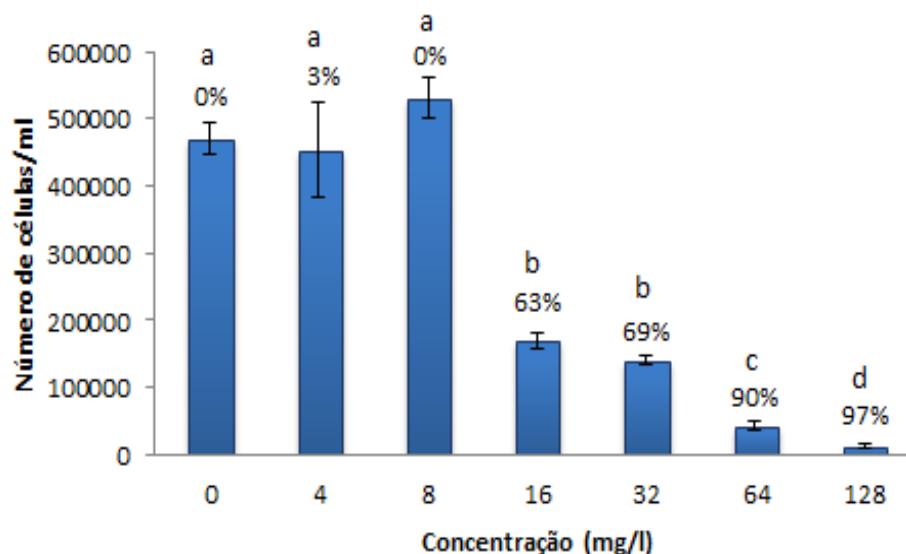


**Figura 6:** Modelo de regressão linear ajustado aos dados da fluorescência e concentração dos microplásticos em meio F/2.

#### 4.2. Avaliação dos efeitos tóxicos

#### 4.2.1. Bioensaio com doxiciclina

No teste com doxiciclina, as concentrações mais elevadas apresentaram uma coloração vermelho-acastanhada (Figura 9). Durante o teste, a variação média do pH foi de 0,54 unidades, sendo a média do valor inicial de 7,89 e a final 8,42 unidades de pH (Anexo II). A variação média da concentração inicial do teste à nominal foi de 14,03% e o decaimento médio às 96 horas de 73,64%. Os valores de pH e variação média da concentração de teste à nominal cumprem as indicações da OECD, permitindo validar o teste. O valor de decaimento médio ultrapassa os 20%, logo deverá considerar-se o resultado com resultante da acção da doxiciclina e dos seus produtos de degradação.



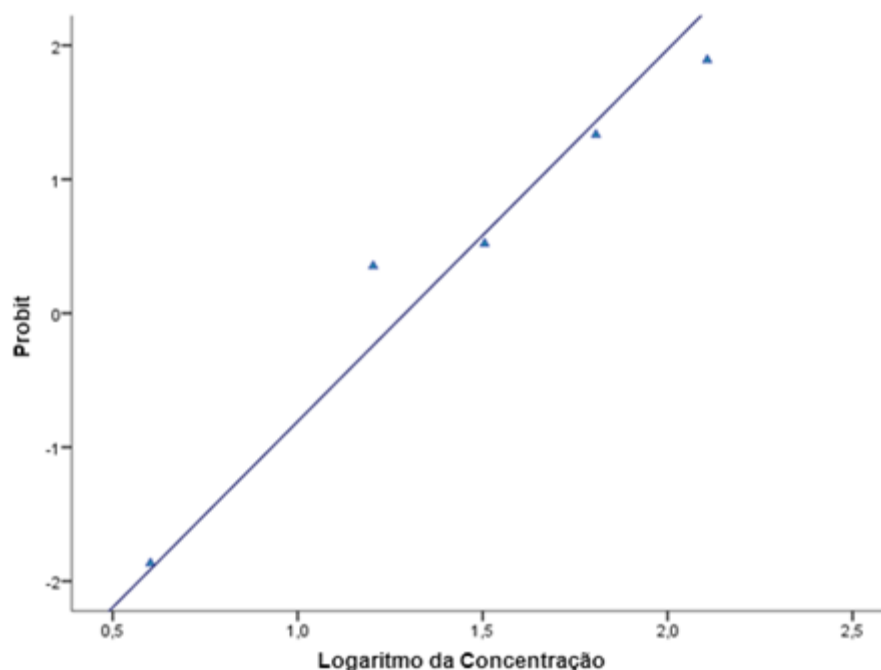
**Figura 7:** Média do número de células com o respectivo erro padrão da média em cada tratamento às 96 horas em algas expostas a doxiciclina e na ausência da substância (controle – 0). Sobre as barras é representada a percentagem média de inibição do crescimento da microalga em cada tratamento e relativamente ao crescimento médio do controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ( $p = 0,05$ ) determinadas pelo teste de comparações múltiplas de tukey efectuado após a ANOVA quando esta análise indicou diferenças significativas ( $p = 0,05$ ) entre tratamentos.

Registaram-se diferenças significativas no crescimento das culturas expostas a distintas concentrações de doxiciclina (ANOVA,  $F_{(6, 14)} = 159,604$ ,  $p = 0,000$ ) tendo ocorrido inibição significativa do mesmo a concentrações iguais ou superiores a 16 mg/l. A  $CE_{50}$  determinado às 96 horas foi de 19,52 mg/l (9.9 – 35.92 mg/l) (Figura 7 e 8, Tabela 2). Em *Chlorella vulgaris* obteve-se uma  $CE_{50}$  às 48 horas de 15,2 mg/l (Fernández *et al.* 2004), o que sugere menor sensibilidade por *Tetraselmis chuii*, em concordância com o resultado observado no bioensaio do dicromato de potássio.

Estudos realizados em *T. chuii* usando oxitetraciclina foi obtido um  $CE_{50}$  às 96 horas de 11,18 mg/l, valor inferior ao obtido no presente trabalho (Ferreira *et al.* 2007). A toxicidade da doxiciclina é inferior à da oxitetraciclina apesar da primeira apresentar maior lipofilicidade e maior actividade antimicrobiana (Chopra e Roberts 2001; Riond e Riviere 1988). Com base no  $CE_{50}$  obtido no presente estudo e a  $CE_{50}$  de 316  $\mu\text{g/l}$  para a planta *Lemna gibba*, que apresenta sensibilidade intermédia entre algas e plantas superiores, seria de esperar maior toxicidade na alga (Brain *et al.* 2004).

Doxiciclina (mg/l)					
72 horas			96 horas		
$CE_{10}$	$CE_{20}$	$CE_{50}$	$CE_{10}$	$CE_{20}$	$CE_{50}$
7,71	10,4	20,83	6,75	9,72	19,52
(1,25-3,74)	(2,79-18,11)	(10,66-37,59)	(1,01-2,32)	(2,47-16,55)	(9,90-35,92)

**Tabela 2:** Valores de CE obtidos às 72 e 96 horas na alga *Tetraselmis chuii* exposta a várias concentrações de doxiciclina.



**Figura 8:** Curva de toxicidade logaritmo (base 10) da concentração da doxiciclina em mg/l versus transformação probit da percentagem de inibição do crescimento de *Tetraselmis chuii* ( $y = 2,777x - 3,584$ ).

A coloração vermelho-acastanhado observada nas concentrações superiores a 16 mg/l (Figura 9) pode dever-se às propriedades do composto ou à formação de produtos de degradação

(Ferreira *et al.* 2007; Sanderson *et al.* 2005). Os principais produtos de fotodecomposição de compostos pertencentes ao grupo das tetraciclina são 4-dedimetilaminotetraciclina, 5,6-anidro-tetraciclina e quinona (Halling-Sørensen *et al.* 2002). A foto-oxidação das tetraciclina, induzida pela radiação ultravioleta, ocorre a taxas relativamente elevadas em meios alcalinos e com elevada concentração de oxigénio, formando uma quinona, que apresenta cor vermelho-acastanhada e tem absorção a 530 nm (Moore *et al.* 1983). É pouco provável que a cor se deva ao composto principal, visto que este sofreu degradação ao longo do período de teste e a cor se manteve. As condições do ensaio e coloração vermelho-acastanhada observada sugerem degradação da doxiciclina em quinona. Apesar destas semelhanças, a determinação da quinona às 96 horas com pico de absorção a 530 nm não foi possível. Apesar de não terem sido identificados, os produtos de degradação em conjunto com a doxiciclina, são responsáveis pelo efeito tóxico obtido no ensaio. A fotólise da doxiciclina promove sua a degradação, mas nem sempre resulta na diminuição da toxicidade, uma vez que os produtos de degradação intermediários revelam ser mais tóxicos e terem maior facilidade na penetração nas células (Yuan *et al.* 2011).



**Figura 9:** Bioensaio da doxiciclina às 96 horas observando-se a câmara de incubação, os frascos com diversas concentrações e o sistema de ar. À esquerda estão presentes os controlos e concentrações inferiores, apresentando uma cor verde intensa devido ao crescimento das algas. Na imagem à direita, observam-se as concentrações superiores que apresentam uma coloração vermelho-acastanha, possivelmente devido à degradação do composto.

A diminuição da transmissão de luz devido à formação da cor vermelho-acastanhada poderá contribuir para a inibição do crescimento de microalgas (Sanderson *et al.* 2005). Por outro lado, a redução da transmissão de luz poderá originar menor multiplicação celular, havendo menos impacto dos tóxicos e levando a que substâncias de cor apresentem maiores  $CE_{50}$

(Cleuvers e Weyers 2003). O efeito de sombra não deverá ser considerado como simples aditivo, visto que o movimento e agitação das algas permitem que sejam expostas a zonas iluminada (Cleuvers e Weyers 2003). A coloração vermelho-acastanhada observada durante o ensaio poderá ser em parte responsável pelo efeito tóxico observado, porém a sua contribuição não pôde ser determinada.

As tetraciclinas podem inibir a síntese proteica do cloroplasto através da ligação à subunidade ribossomal 30S, resultando em decréscimo do conteúdo de clorofila e menor eficiência fotossintética (Wang *et al.* 2015). A mitocôndria sofre por um mecanismo semelhante, resultando em peroxidação lipídica e formação de espécies de oxigénio reactivas (Wang *et al.* 2015). A doxiciclina pode então actuar nos cloroplastos e mitocôndrias da alga, diminuindo a eficiência fotossintética e originando radicais livres de oxigénio, causando inibição do seu crescimento.

A formação de complexos insolúveis com catiões metálicos bivalente pode formar precipitado (Brain *et al.* 2004; Campbell e Hasinoff 1991; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). A formação de complexos poderá estar envolvida na toxicidade, podendo provocar deficiência de minerais ou a forma complexada ultrapassar membranas biológicas com maior facilidade (Brain *et al.* 2004; Campbell e Hasinoff 1991; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). A quelação de cálcio intracelular pode interferir na função celular através da inibição da síntese proteica ou efeito tóxico (Wang *et al.* 2015). Por outro lado, a quelação poderá reduzir a disponibilidade de tetraciclinas no meio e diminuir a sua toxicidade (Halling-Sørensen *et al.* 2002). O meio F/2 é constituído por água de mar suplementada rica em catiões sendo favorável à formação de complexos, resultando em concentrações de  $CE_{50}$  superiores e menor recuperação da substância às 96 horas (Ferreira *et al.* 2007).

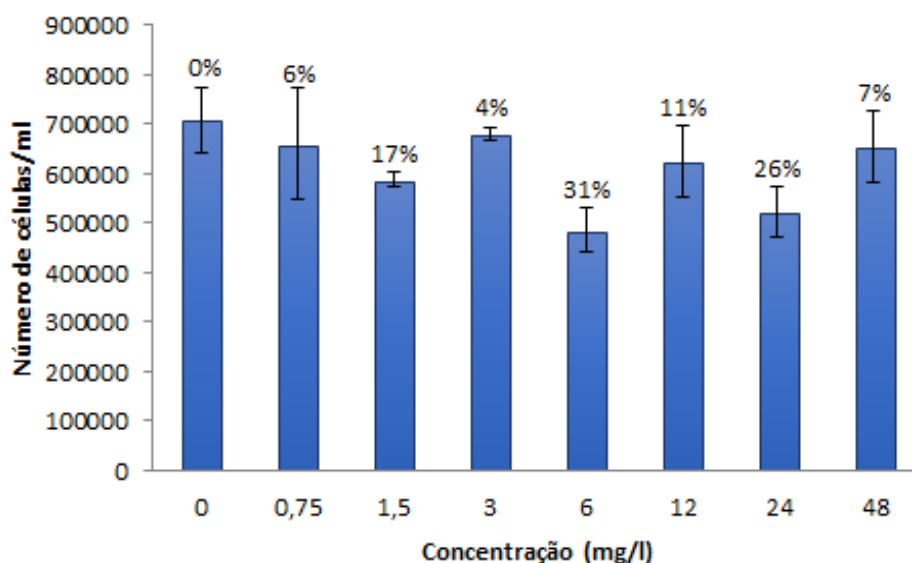
Bioensaios toxicológicos em microalgas envolvendo a exposição a antibióticos presentes no ambiente são importantes visto que estes organismos apresentam elevadas sensibilidades devido à sua constituição unicelular (Ferreira *et al.* 2007). O valor da  $CE_{50}$  da doxiciclina para *T. chuii* é superior aos valores detectados no ambiente actualmente. Concentrações ambientais mais elevadas poderão ser detectadas localmente após administração de antibióticos em aquacultura ou após descarga de bio-sólidos no meio aquático (Fernández *et al.* 2004; Hirsch *et al.* 1999; Rico *et al.* 2013). Os dados relativos à determinação de antibióticos no ambiente, apesar de estarem a aumentar em número, ainda são limitados para uma avaliação global do impacto destes fármacos nos ecossistemas. Por outro lado, seria interessante a realização de mais testes



em organismos marinhos de níveis tróficos superiores para compreender o seu impacto na cadeia trófica marinha, assim como a realização de testes em organismos de outros compartimentos ambientais, como o solo ou o sedimento, onde este fármaco se acumula.

#### 4.2.2. Bioensaio com microplásticos

As esferas de microplásticos conferiram uma tonalidade rosa ao meio, semelhante à sua cor, nas concentrações mais elevadas. Durante o teste, a variação média do pH foi de 1,54 unidades, sendo a média do valor inicial de 8,05 e a final 9,61 unidades de pH (Anexo II). A variação média da concentração inicial do teste à nominal foi de 5,67% e o decaimento médio às 96 horas de 41,9%. A variação média da concentração de teste à nominal cumpre as indicações da OECD. A variação média de pH foi superior às 1,5 unidades de pH recomendadas pela OECD, podendo dever-se ao elevado crescimento das algas devido à ausência de toxicidade (secção 3.1.1.). O decaimento médio dos microplásticos ultrapassou os 20% recomendados na OECD, sendo uma provável causa a adsorção deste material ao vidro dos recipientes utilizados.



**Figura 10:** Média do número de células com o respectivo erro padrão da média em cada tratamento às 96 horas em algas expostas a microplásticos e na ausência da substância (controlo – 0). Sobre as barras é representada a percentagem média de inibição do crescimento da microalga em cada tratamento e relativamente ao crescimento médio do controlo.

No presente estudo não foi possível determinar a  $CE_{50}$  de microplásticos para a alga *T. chuii* (Figura 10), pois não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre o crescimento das culturas expostas a diferentes concentrações de microplásticos (ANOVA,  $F_{(7, 16)} = 1,516$ ,  $p = 0,231$ ). Os resultados do presente estudo estão de acordo com os obtidos num estudo

anterior, utilizando a mesma espécie de alga e concentrações de microplásticos até 1,472 mg/l (Davarpanah e Guilhermino 2015). Por outro lado, a concentrações de 250 mg/l foi possível detectar-se inibição provocada por microplásticos em microalgas das espécies *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlorella vulgaris* (Sjollema *et al.* 2016). As concentrações testadas (0,75 a 48 mg/l) podem ter sido insuficientes para causar inibição do crescimento, podendo os microplásticos apresentar toxicidade em concentrações mais elevadas.

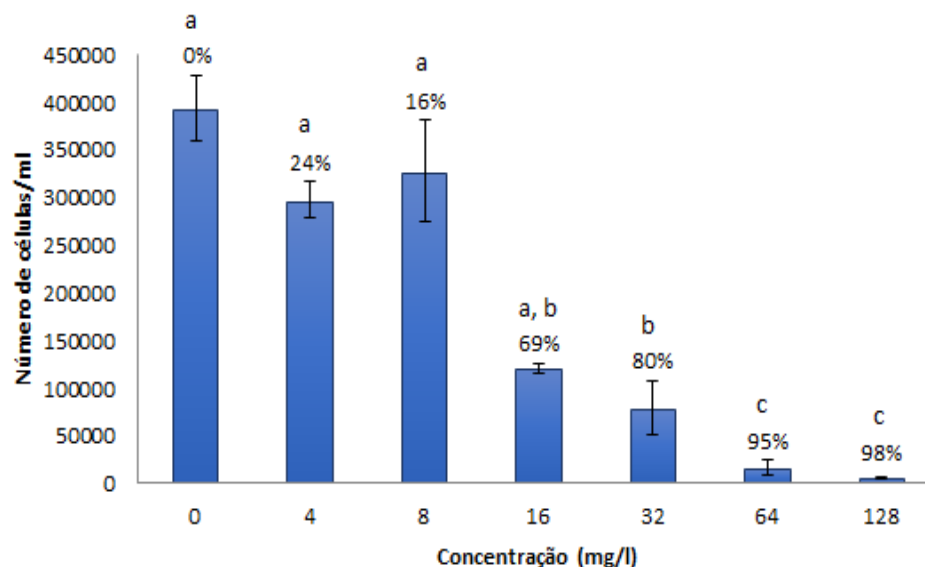
O decaimento registado às 96 horas poderá ser provocado pela precipitação e adsorção dos microplásticos ao frasco, originando diminuição da sua concentração no meio e consequentemente menor efeito tóxico (Davarpanah e Guilhermino 2015). A precipitação poderá, em parte, ser explicada pela densidade dos microplásticos usados (1,3 g/ml) ser superior à densidade da água do mar (1,03 g/ml) (Engler 2012). Os microplásticos usados apresentavam tamanhos entre 1 a 5 µm, sendo difícil ultrapassarem a parede celular ou internalizarem-se através dos poros (Davarpanah e Guilhermino 2015; Sjollema *et al.* 2016). Por outro lado, poderão formar agregados entre si, originando partículas maiores (Davarpanah e Guilhermino 2015). Em geral, quanto menor a dimensão da partícula de plástico, maior é o seu efeito adverso (Sjollema *et al.* 2016).

Na contagem celular, foram observadas estruturas com microplásticos aderidos, semelhantes a polissacarídeos excretados por algas. Várias espécies de algas quando expostas a *stress*, como limitações de luz e nutrientes, excretam polissacarídeos (Long *et al.* 2015). Polissacarídeos e biofilmes formam agregados extracelulares que podem incorporar microplásticos, alterando a sua permeabilidade e densidade (Andrady 2011; Long *et al.* 2015). Os agregados poderão concentrar plásticos e alterar a sua biodisponibilidade, aumentando o risco de exposição de certos organismos (Long *et al.* 2015). Durante a contagem celular, foram observados agregados extracelulares contendo microplásticos, podendo ser responsáveis pela diminuição da concentração de microplásticos no meio e baixa toxicidade registada (Figura 10). Em cenários reais a incorporação de microplásticos em biofilmes poderá originar o seu transporte para o fundo oceânico (Andrady 2011; Long *et al.* 2015). Apesar de terem sido observadas estas estruturas, não foi encontrada referência na literatura a este processo na espécie testada.

#### **4.2.3. Bioensaio com Doxíciclina na presença de Microplásticos**

Tal como no ensaio com a doxíciclina, formou-se uma coloração vermelho-acastanhada nas concentrações mais elevadas. Durante o teste, a variação média do pH foi de 0,84 unidades, sendo a média do valor inicial de 8,07 e a final 8,96 unidades de pH (Anexo II). Na doxíciclina, a

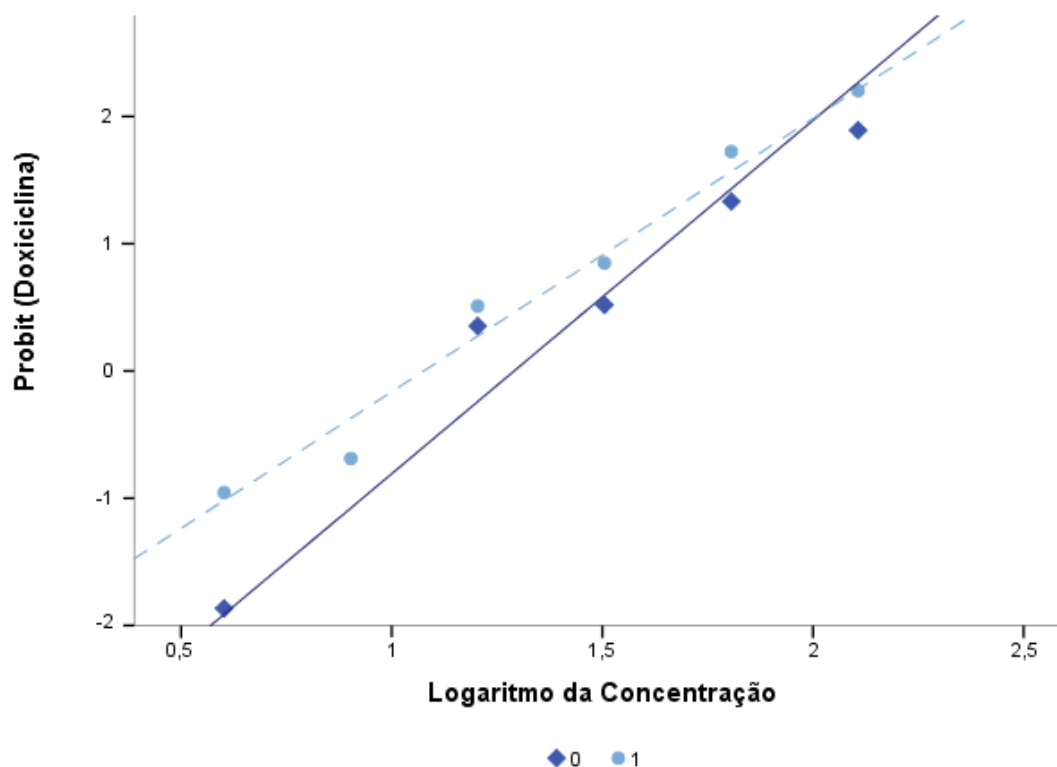
variação média da concentração inicial do teste à nominal foi de 17,59% e o decaimento médio às 96 horas de 59,59%. Nos microplásticos, a variação média da concentração inicial do teste à nominal foi de 5,16% e o decaimento médio às 96 horas de 42,41%. Os valores de pH e variação média da concentração de teste à nominal cumprem as indicações da OECD, permitindo validar o teste. O valor de decaimento médio da doxiciclina e microplásticos ultrapassam os 20%, como observado nos testes anteriores (secção 4.2.1. e 4.2.2.).



**Figura 11:** Média do número de células com o respectivo erro padrão da média em cada tratamento às 96 horas em algas expostas a doxiciclina na presença de 1,5 mg/l de microplástico e na ausência das substâncias (controlo – 0). Sobre as barras é representada a percentagem média de inibição do crescimento da microalga em cada tratamento e relativamente ao crescimento médio do controlo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre grupos ( $p=0,05$ ) determinadas pelo teste de comparações múltiplas de tukey efectuado após a ANOVA quando esta análise indicou diferenças significativas ( $p=0,05$ ) entre tratamentos.

Doxiciclina na presença de Microplásticos (mg/l)					
72 horas			96 horas		
CE <sub>10</sub>	CE <sub>20</sub>	CE <sub>50</sub>	CE <sub>10</sub>	CE <sub>20</sub>	CE <sub>50</sub>
6,71	10,10	22,11	3,01	4,83	11,90
(1,45-12,13)	(3,22-16,89)	(12,26-38,60)	(0,54-5,85)	(1,32-8,40)	(6,28-19,62)

**Tabela 3:** Valores de CE obtidos às 72 e 96 horas na alga *Tetraselmis chuii* exposta a várias concentrações de doxiciclina na presença de microplásticos.



**Figura 12:** Curva de toxicidade logaritmo (base 10) da concentração em mg/l da doxiciclina (0) e doxiciclina na presença de microplásticos (1) versus transformação probit da porcentagem de inibição do crescimento de *Tetraselmis chuii* (doxiciclina  $y = 2,777 x - 3,584$ ,  $R = 0,956$ ; doxiciclina na presença de microplásticos  $y = 2,147 x - 2,31$ ,  $R^2 = 0,977$ ).

O resultado do teste de homogeneidade de variâncias de Levene ( $p = 0,029$ ) violou os princípios da ANOVA, não permitindo validar os seus resultados mesmo recorrendo a várias transformações (ANOVA,  $F_{(6, 14)} = 44,812$ ,  $p = 0,000$ ). Foi então utilizado o teste de Welch que confirmou a presença de uma diferença estatisticamente significativa entre as várias concentrações de doxiciclina na presença de microplásticos ( $p = 0,000$ ). A doxiciclina na presença de plástico apresentou uma  $CE_{50}$  de 11,90 mg/l (6,28 – 19,62 mg/l) (Figura 11, Tabela 3). Esta concentração é inferior à calculada para o efeito isolado da doxiciclina (Figura 7, Tabela 2), tendo a comparação das curvas de toxicidade indicado diferenças significativas entre os efeitos da doxiciclina na presença e ausência de microplásticos (ANCOVA, concentrações de doxiciclina  $F_{(1, 8)} = 225,63$   $p = 0,000$ , explicando 96,6% da variabilidade; presença de microplásticos  $F_{(2, 8)} = 70,063$   $p = 0,000$ , explicando 94,6% da variabilidade) (Figura 12). Estes resultados indicam que apesar da sobreposição dos intervalos de confiança da  $CE_{50}$  calculadas na presença e ausência de microplásticos, estas partículas aumentam a toxicidade do antibiótico, pelo menos a concentrações baixas dentro da gama testada.

Num estudo realizado por Davarpanah e Guilhermino (2015) com a mesma espécie de microalga, a presença de microplásticos não causou alteração da toxicidade do cobre, possivelmente devido à baixa concentração de microplásticos usada (0,184 mg/l) ou às características inerentes ao metal. Por outro lado, em outro trabalho realizado com peixes, os microplásticos causaram a diminuição da toxicidade do pireno, mas tiveram efeitos negativos sobre enzimas da respiração celular (Oliveira *et al.* 2013). No presente estudo, é possível que os microplásticos tenham interferido nos mecanismos fisiológicos da alga, não sendo suficiente para apresentar toxicidade relevante quando em isolado, mas sujeitando a célula a maior *stress* e causando aumento da toxicidade de outros compostos.

Os microplásticos podem funcionar como vector ao adsorver, concentrar e transportar contaminantes (Andrady 2011; Bhattacharya *et al.* 2010; Thompson 2009). A adsorção aos microplásticos está relacionada com a hidrofobicidade do composto, ocorrendo em maior grau em compostos hidrofóbicos, e salinidade da água, podendo estimular a adsorção através da diminuição da solubilidade do composto (Wu *et al.* 2016). É possível que tenha ocorrido adsorção da doxiciclina aos microplásticos devido às propriedades lipofílicas do fármaco e salinidade do meio (30‰) (Chopra e Roberts 2001; Katsung *et al.* 2012; Riond e Riviere 1988). Devido à adsorção do fármaco, os microplásticos podem causar localmente exposição dos organismos a maiores concentrações, causando maior resposta ao tóxico. A internalização de microplásticos pelas células também poderá constituir uma via de exposição a elevadas doses de contaminantes concentrados nestas partículas. No entanto é pouco provável que neste estudo ocorra internalização através de poros ou a passagem através da parede celular devido ao tamanho dos microplásticos usados (1 – 5 µm) (Davarpanah e Guilhermino 2015; Sjollem *et al.* 2016). Outro processo que poderá ter impactos negativos na fisiologia da célula é a adsorção à parede celular, que pode impedir o fluxo de nutrientes, promover a produção de radicais livres de oxigénio e impedir o movimento do flagelo (Bhattacharya *et al.* 2010; Sjollem *et al.* 2016). Neste trabalho foi observada a presença de microplásticos na superfície das algas, sugerindo adsorção à parede celular. Assim, a doxiciclina na presença de microplásticos poderá apresentar maior efeito tóxico através da exposição dos organismos a maiores concentrações causada pela adsorção do fármaco aos microplásticos e destes à parede celular, ou devido ao *stress* acrescido resultado da adsorção dos microplásticos à superfície da alga. Durante a contagem de células foram observados agregados contendo microplásticos e microalgas como o referido no bioensaio dos microplásticos (secção 4.2.2.). As algas poderão ter libertado polissacarídeos que incorporaram microplásticos (Andrady 2011; Long *et al.* 2015). Se os microplásticos presentes em agregados

concentrarem doxíclicina, as células na vizinhança ou presentes no agregado poderão estar sujeitas a concentrações superiores de fármaco, o que se pode originar maior efeito tóxico.

A adsorção e concentração de poluentes a microplásticos foi descrita em ensaios laboratoriais e em análises de amostras recolhidas no ambiente (Andrady 2011; Bakir *et al.* 2012; Ogata *et al.* 2009). Nestes estudos, sugere-se que a presença de plásticos aumentou a disponibilidade de contaminantes na cadeia trófica, estando os organismos aquáticos expostos aos compostos presentes na coluna de água e na dieta através da ingestão destas partículas (Engler 2012). Os autores observaram uma correlação positiva entre a concentração de poluentes em microplásticos recolhidos em praias e os tecidos de moluscos da região estudada, sugerindo a ocorrência deste mecanismo (Ogata *et al.* 2009). Nos organismos, durante o processo digestivo, os surfactantes tendem a mobilizar os poluentes transportados pelos microplásticos, tornando-os disponíveis e permitindo-lhes exercer toxicidade (Engler 2012; Vandermeersch *et al.* 2015). O risco para os seres vivos e ecossistemas e da exposição a que o humano está sujeito através da dieta ainda não é conhecido, sendo necessário aprofundar os conhecimentos nesta área (Engler 2012; Thomson 2009; Vandermeersch *et al.* 2015).

## 5. Conclusão

---

Numa primeira fase deste trabalho adquiriu-se treino nos métodos de cultura da microalga marinha *Tetraselmis chuii*, utilizando-se o meio F/2, efectuando-se manutenção de culturas desta espécie, optimizando alguns aspectos dos protocolos, e realizando-se a curva de crescimento de culturas laboratoriais. Foi ainda realizado um teste de toxicidade com uma substância de referência (dicromato de potássio) de forma a optimizar a metodologia dos bioensaios de toxicidade com *T. chuii* e a avaliar o estado de saúde das culturas da microalga marinha. O resultado do teste ( $CE_{50} = 5,46$  mg/l) revelou que as culturas laboratoriais da microalga estavam em condições de saúde adequadas, sugerindo ainda uma menor sensibilidade desta espécie ao dicromato de potássio relativamente a outras espécies de microalgas.

Posteriormente, foram realizados 3 bioensaios de 96 horas utilizando como critério de efeito tóxico a inibição do crescimento das culturas de *T. chuii*: (i) um ensaio para avaliar a toxicidade do fármaco, (ii) um ensaio para avaliar a toxicidade dos microplásticos, (iii) um ensaio para avaliação da toxicidade da doxíclicina na presença de microplásticos. Os resultados do primeiro ensaio indicam que a doxíclicina sofreu degradação no meio de teste, sendo detectada em menores concentrações às 96 horas. Obteve-se uma  $CE_{50}$  de 19,52 mg/l indicando que a

doxíciclina e/ou os seus produtos de degradação e/ou metabolitos são tóxicos para *T. chuii* na gama das ppm, o que levou à rejeição da  $H_{01}$ . Aceitou-se a hipótese alternativa, isto é, que a doxíciclina e/ou os seus produtos de degradação e/ou metabolitos causam efeitos tóxicos em *T. chuii* a concentrações na ordem dos ppm. No segundo ensaio, não houve inibição significativa do crescimento de *T. chuii* pelos microplásticos testados até à concentração de 48 mg/l. Portanto, os microplásticos não apresentaram efeitos tóxicos para *T. chuii* nas concentrações testadas, pelo que se aceita a hipótese nula  $H_{02}$ . Finalmente, os resultados do terceiro bioensaio realizado indicaram um aumento da toxicidade da doxíciclina e/ou os seus produtos de degradação e/ou metabolitos ( $CE_{50} = 11,90$  mg/l), apresentando diferenças estatísticas entre as curvas de toxicidade na presença e ausência de microplásticos. Estes resultados levam à rejeição da  $H_{03}$ , aceitando-se a hipótese alternativa, isto é, de que a presença de microplásticos tem influência na toxicidade da doxíciclina para *T. chuii*.

Os valores testados tinham como objectivo a determinação da  $CE_{50}$  e do efeito de microplásticos na toxicidade de um fármaco, não representando concentrações ambientais. No entanto, elevadas concentrações de microplásticos e fármacos poderão ocorrer em situações excepcionais, como após descargas de bio sólidos ou *pellets*. A presença de microplásticos poderá influenciar a toxicidade de vários contaminantes presentes no ambiente e o seu risco para os ecossistemas e para saúde do ser humano ainda é desconhecido. Este estudo teve como objectivo aprofundar os conhecimentos acerca da interacção e efeito dos microplásticos na toxicidade de um fármaco, nomeadamente um antibiótico. Os resultados obtidos levantam preocupações relativamente à possibilidade da ocorrência de maior toxicidade de poluentes na presença de microplásticos, sendo necessária uma investigação mais detalhada nesta área, bem como a criação de normas que se reflitam na redução da contaminação do ambiente. Relativamente aos microplásticos, novas medidas deverão ser tomadas quanto a redução do consumo, reutilização e reciclagem de plásticos. Quanto aos antibióticos, a sua concentração ambiental poderá ser reduzida através de novas regras quanto à utilização e monitorização do seu consumo, da diminuição da utilização como promotores de crescimento, e do desenvolvimento de métodos de tratamento de bio sólidos e efluentes.

## 6. Bibliografia

---

Almeida A, Duarte S, Nunes R, Rocha H, Pena A, Meisel L (2014) "Human and veterinary antibiotics used in Portugal - a ranking for ecosurveillance" **Toxics** 2, 188 – 225

Andrady AL (2011) "Microplastics in the marine environment" **Marine Pollution Bulletin** 62,

1596 – 1605

Bakir A, Rowland SJ, Thompson RC (2012) "Competitive sorption of persistent organic pollutants onto microplastics in the marine environment" **Marine Pollution Bulletin** 64, 2782 – 2789

Bhattacharya P, Lin S, Turner JP, Ke PC (2010) "Physical adsorption of charged plastic nanoparticles affects algal photosynthesis" **Journal of Physical Chemistry** 114, 16556 – 16561

Besseling E, Wang B, Lüring M, Koelmans AA (2014) "Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*" **Environmental Science & Technology** 48, 12336 - 12343

Borecka M, Białk-Bielińska, Haliński ŁP, Pazdro K, Stepnowski P, Stolte S (2016) "The influence of salinity on the toxicity of selected sulfonamides and trimethoprim towards the green algae *Chlorella vulgaris*" **Journal of Hazardous Materials** 308, 179 – 186

Brain RA, Johnson DJ, Richards SM, Sanderson H, Sibley PK, Solomon KR (2004) Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static-renewal test" **Environmental Toxicology and Chemistry** 23, 371 – 382

Campbell NRC, Hasinoff BB (1991) "Iron supplements: a common cause of drug interactions" **British Journal of Clinical Pharmacology** 31, 251 – 255

Chopra I, Roberts M (2001) "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance" **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 232 – 260

Cleuvers M, Weyers A (2003) "Algal growth inhibition test: does shading of coloured substances really matter?" **Water Research** 37, 2718 – 2722

Creswell LR (2010) "Phytoplankton culture for aquaculture feed" **Southern Regional Aquaculture Center** 5004, 1 – 12

Davarpanah E, Guilhermino L (2015) "Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii*" **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 167A, 269 – 275

Engler RE (2012) "The complex interaction between marine debris and toxic chemicals in the ocean" **Environmental Science and Technology** 46, 12302 – 12315

Environmental Science and Technology Center (2007) "Biological test method: growth inhibition test using a freshwater alga" **Environment Canada** EM 1/RM/25, 27 – 29

Eriksen M, Maximenko N, Thiel M, Cummins A, Lattin G, Wilson S, Hafner J, Zellers A, Rigman S (2013) "Plastic pollution in the South Pacific subtropical gyre" **Marine Pollution Bulletin** 68, 71 – 76

European Chemicals Agency (2008) "Guidance on information requirements and chemical



safety assessment. Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment" **Guidance for the implementation of REACH**, 8 – 11

Fernández C, Alonso C, Babín MM, Pro J, Carbonell G, Tarazona JV (2004) "Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems" **Science of the Total Environment** 323, 63 – 69

Ferreira CSG, Nunes BA, Henriques-Almeida JMM, Guilhermino L (2007) "Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and the crustacean *Artemia parthenogenetica*" **Ecotoxicology and Environmental Safety** 67, 452 – 458

Frias JPGL, Otero V, Sobral P (2014) "Evidence of microplastics in samples of zooplankton from portuguese costal waters" **Marine Environmental Research** 95, 89 – 95

Gorokhova E (2015) "Screening for microplastic particles in plankton samples: how to integrate marine litter assessment into existing monitoring programs?" **Marine Pollution Bulletin** 99, 271 – 275

Graeme KA, Pollack CV (1996) "Anbiotic use in the emergency department. II. the aminoglycosides, macrolides, tetracyclines, sulfa drugs and urinary antiseptics" **Journal of Emergency Medicine** 14, 361 – 371

Guillard RL (1975) "Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates" **Culture of Marine Invertebrate Animals** (Smith W.L and Chanley M.H.) Plenum Press, 26 – 60

Halling-Sørensen B, Sengeløv G, Tjørnelund J (2002) "Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria" **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 42, 263 – 271

Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL (1999) "Occurrence of antibiotics in the aquatic environment" **The Science of the Total Environment** 225, 109 – 118

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ (2012) "Tetracyclines, macrolides, clindamycin, chloramphenicol, streptogramins, & oxazolidinones" in **Basic & Clinical Pharmacology** 12<sup>o</sup> Ed, McGraw-Hill Medical, 809 – 813

Lofty HM, Hegazy MA, Mowaka S, Mohamed EH (2016) "Validated spectrophotometric methods for simultaneous determination of omeprazole, tinidazole and doxycycline in their ternary mixture" **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biochemical Spectroscopy** 153, 321 – 332

Long M, Moriceau B, Gallinari M, Lambert C, Huver A, Raffray J, Soudant P (2015) "Interactions between microplastics and phytoplankton aggregates: impact on their respective fates" **Marine Chemistry** 175, 39 – 46

Milić N, Milanović M, Letić NG, Sekulić MT, Radonić J, Mihajlović I, Miloradov MV (2013) "Occurrence of antibiotics as emerging contaminant substances in aquatic environment"

**International Journal of Environmental Health Research** 23, 296 – 310

Moore DE, Fallon MP, Burt DC (1983) "Photo-oxidation of tetracycline - a differential pulse polarographic study" **International Journal of Pharmaceutics** 14, 133 – 142

Na G, Fang X, Cai Y, Ge L, Zong H, Yuan X, Yao Z, Zhang Z (2013) "Occurrence, distribution, and bioaccumulation of antibiotics in coastal environments of Dalian, China" **Marine Pollution Bulletin** 69, 233 – 237

National Oceanographic and Atmospheric Agency "What are microplastics?"

<https://marinedebris.noaa.gov/discover-issue/types-and-sources> (consulta em Maio de 2016)

Norén F (2007) "Small plastic particles in costal swedish waters" **KIMO**, Sweden

Nunes B, Carvalho F, Guilhermino L (2005) "Acute toxicity of widely used pharmaceuticals in aquatic species: *Gambusia holbrooki*, *Artemia parthenogenetica* and *Tetraselmis chuii*"

**Ecotoxicology and Environmental Safety** 61, 413 – 419

Nunes B, Margarida FC, Carvalho F, Guilhermino L (2008) "The microalga *Tetraselmis chuii* (Chlorophyceae) in ecotoxicology: culture conditions and growth model" **Fresenius Environmental Bulletin** 17, 4, 408 – 414

OECD (2011) "Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test" **OECD Publishing**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 1 – 25

Ogata Y, Takada H, Mizukawa K, Hirai H, Iwasa S, Endo S, Mato Y, Saha M, Okuda K, Nakashima A, Murakami M, Zurcher N, Booyatumanondo R, Zakaria MP, Dung LQ, Gordon M, Miguez C, Suzuki S, Moore C, Karapanagioti HK, Weerts S, McClurg T, Burres E, Smith W, Velkenburg MV, Lang JS, Lang RC, Laursen D, Danner B, Stewardson N, Thompson RC (2009) "International Pellet Watch: global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs" **Marine Pollution Bulletin** 58, 1437 – 1446

Oliveira M, Ribeiro A, Hylland K, Guilhermino L (2013) "Single and combined effects of microplastics and pyrene on juveniles (0+ group) of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae)" **Ecological Indicators** 34, 641 – 647

PlasticsEurope (2015) "Plastics — The Facts: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data" [plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2015.aspx?FolID=2](http://plasticseurope.org/Document/plastics---the-facts-2015.aspx?FolID=2) (consulta em Maio de 2016)

RASFF (2016) "RASFF Portal" [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1)

[window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1) (consulta em Maio de 2016)

Rico A, Phu TM, Satapornvanit K, Min J, Shahabuddin AM, Heriksson PJG, Murray FJ, Little DC, Dalsgaard A, Van den Brink PJ (2013) "Use of veterinary medicines, feed additives and

probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia" **Aquaculture** 412 - 413, 231 – 243

Riond JL, Riviere JE (1988) "Pharmacology and toxicology of doxycycline" **Veterinary and Human Toxicology** 30, 431 – 44

Sá LC, Luís LG, Guilhermino L (2015) "Effects of microplastics on juveniles of the common goby (*Pomatoschistus microps*): confusion with prey, reduction of the predatory performance and efficiency, and possible influence of developmental conditions" **Environmental Pollution** 196, 359 -362

Sanderson H, Ingerslev F, Brain RA, Halling-Sørensen B, Bestari JK, Wilson CJ, Johnson DJ, Solomon KR (2005) "Dissipation of oxytetracycline, chlortetracycline, tetracycline and doxycycline using HPLC-UV and LC/MS/MS under aquatic semi-field microcosm conditions" **Chemosphere** 60, 619 – 629

Sena MM, Scarmini IS, Collins KE, Collins CSH (2000) "Speciation of aqueous chromium(VI) solutions with the aid of Q-mode factor analysis followed by oblique projection" **Talanta** 53, 453 – 461

Sjollema BS, Redondo-Hasselerharm P, Leslie HA, Kraak MHS, Vethaak AD (2016) "Do plastic particles affect microalgal photosynthesis and growth?" (2016) **Aquatic Toxicology** 170, 259 - 261

Thompson RC (2009) "Microplastics in the Marine Environment: Sources, Consequences and Solutions" **Marine Anthropogenic Litter**, 185 – 200

Vandermeersch G, Cauwenberghe LV, Janssen CR, Marques A, Granby K, Fait G, Kotterman MJJ, Diogène J, Bekaert K, Robbens J, Devriese L (2015) "A critical view on microplastic quantification in aquatic organisms" **Environmental Research** 143, 46 – 55

Wang X, Ryu D, Houtkooper RH, Auwerx J (2015) "Antibiotic use and abuse: a threat to mitochondria and chloroplasts with impact on research, health, and environment" **Bioessays** 37, 1045 – 1053

Wu C, Zang K, Huang X, Liu J (2016) "Sorption of pharmaceuticals and personal care products to polyethylene debris" **Environmental Science and Pollution Research** 23, 8819 – 8826

Yuan F, Hu C, Hu X, Wei D, Chen Y, Qu J (2011) "Photodegradation and toxicity changes of antibiotics in UV and UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> process" **Journal of Hazardous Materials** 185, 1256 - 1263

## Anexos

---

### **Anexo I: Meio enriquecido F/2 de Guillard**

Macronutrientes	
NaNO <sub>3</sub>	75 mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5 mg/l
Metais	
Na <sub>2</sub> .EDTA <sup>+</sup>	4,36 mg/l
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	3,15 mg/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,01 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,022 mg/l
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,01 mg/l
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,18 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,006 mg/l
Vitaminas	
Tiamina.HCl	0,1 mg/l
Biotina	0,5 mg/l
B <sub>12</sub>	0,5 mg/l

**Tabela 1:** Composição do meio F/2 representando a quantidade de nutrientes presentes em um litro de água do mar filtrada (Guillard 1975).

**Anexo II: Tabelas de pH dos bioensaios**

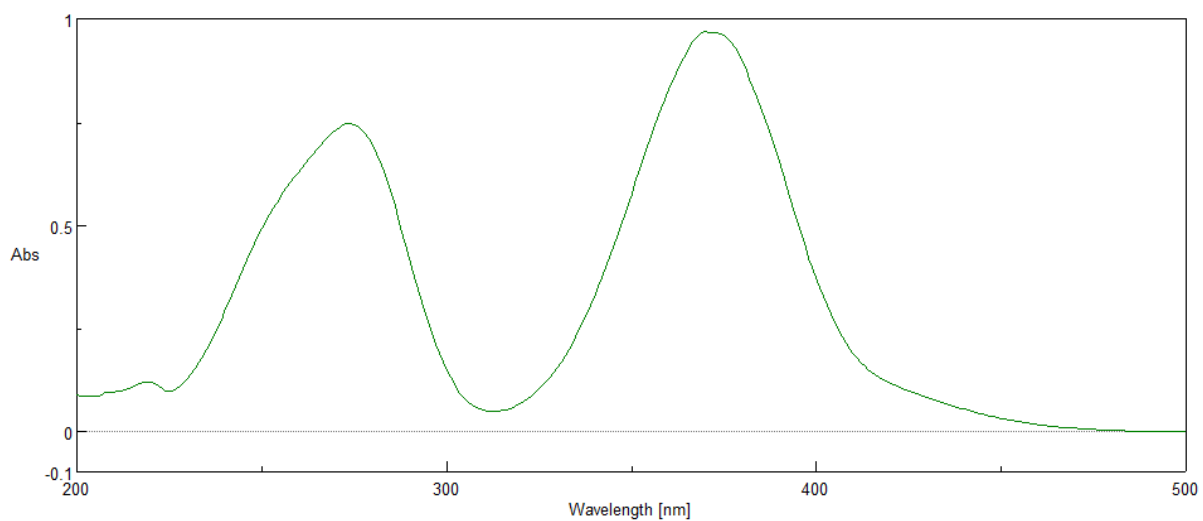
Concentração (mg/l)	Dicromato de potássio		Doxiciclina		Doxiciclina com Microplásticos	
	0h	96h	0h	96h	0h	96h
0	8,11	9,37	8,21	8,77	8,08	9,07
0	8,1	9,27	8,11	8,87	8,27	9,75
0	8,13	9,4	8,13	8,89	8,29	9,65
2	8,06	8,88	8,11	8,77	8,38	9,7
2	8,08	9,36	8,16	8,05	8,43	9,86
2	8,19	9,31	8,14	8,97	8,28	9,94
4	8,12	9,15	8,11	8,87	8,3	9,77
4	8,08	9,14	8,17	8,94	8,37	9,77
4	8,09	9,54	8,13	8,85	8,44	9,53
8	7,99	9,22	8,06	8,84	8,37	9,21
8	7,99	9,22	8,12	8,75	8,32	9,68
8	8,01	9,06	8,07	8,73	8,37	9,75
16	7,87	9,19	8,02	8,39	8,46	8,66
16	7,88	8,22	7,99	8,35	8,17	8,83
16	7,91	8,7	8,01	8,27	8,29	8,76
32	7,89	8,08	7,82	8,23	8,15	8,35
32	7,67	8,08	7,59	8,2	8	8,15
32	7,6	8,04	7,73	8,25	8,06	8,17
64	7,12	7,97	7,54	8,04	7,64	7,84
64	7,23	7,93	7,57	8,01	7,82	7,91
64	7,15	7,93	7,52	7,96	8,03	8
128	6,7	7,34	7,28	7,78	7,21	7,68
128	6,72	7,84	7,33	7,63	6,89	6,67
128	6,69	7,73	7,37	7,72	5,61	7,21

**Tabela 2:** Valores de pH obtidos no início e fim dos bioensaios do dicromato de potássio, doxiciclina e doxiciclina com microplásticos.

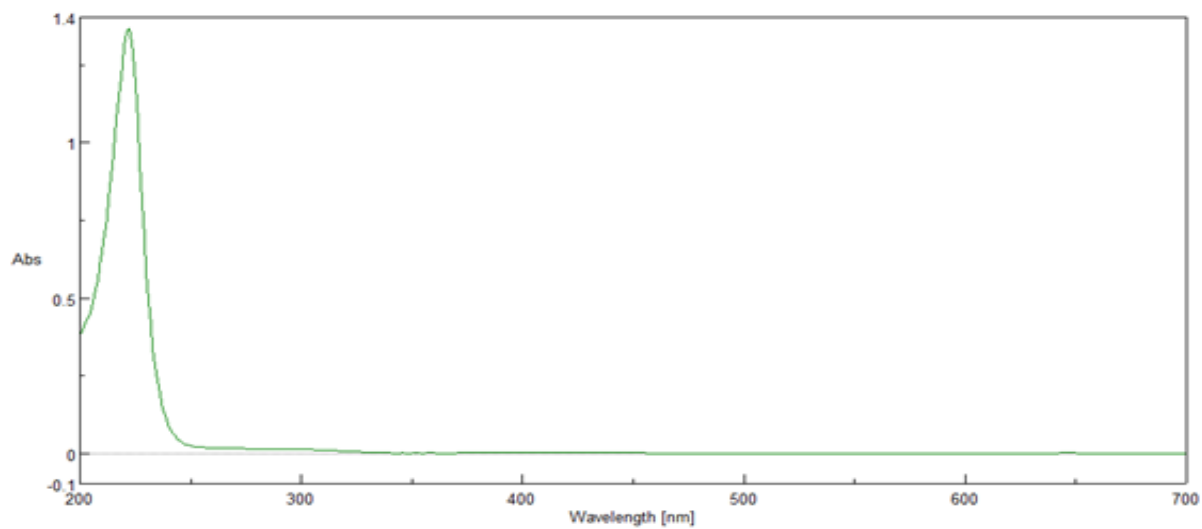
Concentração (mg/l)	Microplásticos	
	0h	96h
0	7,86	9,45
0	8,03	9,69
0	8,02	9,59
0,75	8,06	9,48
0,75	8,05	9,69
0,75	7,84	10
1,5	8,1	10
1,5	8,05	10,07
1,5	8,11	9,93
3	8,05	9,87
3	8,1	10,05
3	8,09	9,92
6	8,09	9,45
6	8,13	9,52
6	8,12	9,37
12	8	9,37
12	8,1	9,23
12	8,16	9,1
24	7,92	9,42
24	8,02	9,44
24	8,04	9,48
48	8,05	9,22
48	8,06	9,38
48	8,08	9,88

**Tabela 3:** Valores de pH obtidos no início e fim do teste com microplásticos.

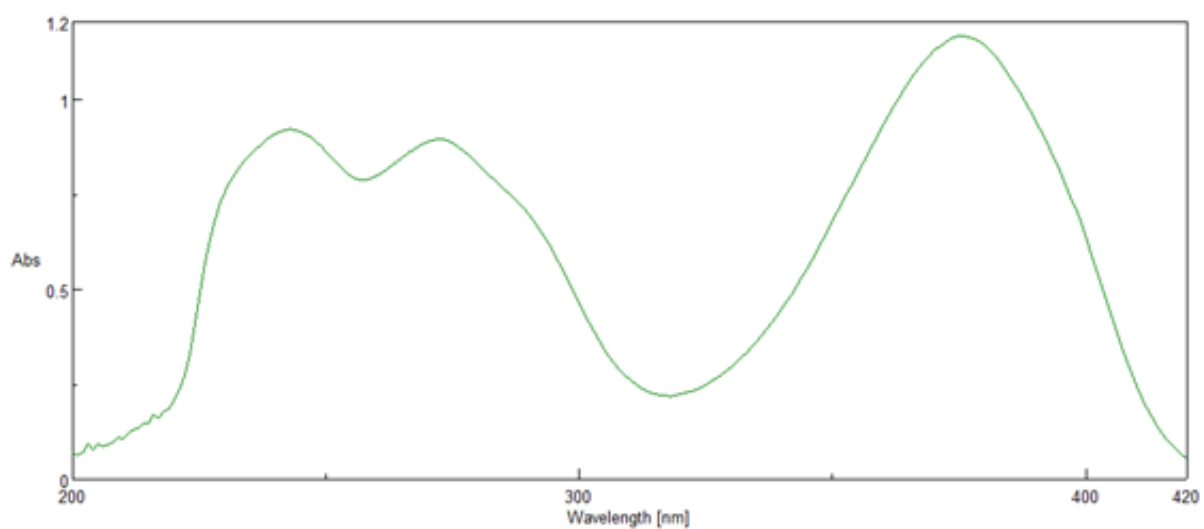
### **Anexo III: Espectros de absorção dos compostos**



**Figura 1:** Espectro de absorção do dicromato de potássio em meio F/2 na concentração de 32 mg/l. Observam-se picos de absorvância a 274 nm e 370 nm.



**Figura 2:** Espectro de absorção do meio F/2. Observa-se o pico a 222 nm.



**Figura 3:** Espectro de absorção da doxiciclina em meio F/2 na concentração de 32 mg/l. Observam-se picos de absorvância a 245 nm, 272 nm e 375 nm.